ヒドラジン分解または酵素による分解

商品 ヒドラクラブY2100（品番：J801）
※商品案内5ページ参照

J-オイルミルズ
メーカー略号：JOM

糖鎖切り出し法の比較

	酵素	ヒドラジン分解（液相）	ヒドラジン分解（気相）
時間	5日以上	ヒドラジン除去に時間がかかる	1日
操作性	多検体になると煩雑	多検体になると煩雑	簡単な操作
多検体	クロマト操作が必要なので，多検体には不向き。	多検体同時処理可能	多検体同時処理可能
安全性	安全	試薬に接触する可能性あり。	安全
機器・器具	クロマトカラム 恒温器	ブロックヒーター ネジロバイアル 真空ポンプ	気相式ヒドラジン分解装置 真空ポンプ
選択性	N型糖鎖のみ	N型，O型糖鎖とも	N型，O型糖鎖とも
タンパク質の構造	構造を維持（但し，事前にプロテアーゼで処理している場合には，断片化している。）	アミノ酸ヒドラジドに分解	アミノ酸ヒドラジドに分解
まとめ	検体数が1個の場合，安価で手軽。	ヒドラジン分解の入門。 初期投資少。	多検体からの疾病マーカーの探索やプロテオーム解析（翻訳後修飾）などハイスループット処理向き。

1 酵素による分解操作（*N*-グリコペプチダーゼ，*O*-グリカナーゼ）

1-1 使用する機器や器具

・恒温槽

・遠心機（遠心加速度 5,000Gが可能なもの）

1-2 *N*-グリコペプチダーゼの反応

1-2-1 使用する試薬

・*N*-グリコペプチダーゼ ＜Almond由来＞

・0.2Mリン酸-クエン酸緩衝液（pH5.1）

・冷エタノール

1-2-2 操作

1. 1㎛olの糖ペプチドあるいは100㎍の糖タンパク質（天然あるいは変性させたもの）に適当量の0.2Mリン酸-クエン酸緩衝液（pH5.1）を添加し，良く混和する。
2. 5～20Unitの*N*-グリコペプチダーゼを加える。
3. 37℃で30分から24時間反応させる。
4. 沸騰水浴中で溶液を3分間加熱して反応をとめる。
5. 3倍量の冷エタノールを添加し，10分間遠心（5,000G）する。
6. 上清を回収する。

1-2-3 参考

5，6の操作は限外ろ過フィルターを用いて，遠心濾液中のオリゴ糖を回収することもできます。

1-2-4 注意

・基質糖ペプチドのペプチド部はアミノ酸3～20個の大きさのペプチドが適当です。
・ペプチド部のアミノ酸がアスパラギン1個しかないものからは糖鎖を遊離しません。したがってグリコペプチダーゼ消化に先立ってプロテアーゼ消化をおこなう場合には以下の方法をおすすめします。

Ⅰ：シアル酸を残す場合
タンパク質を還元カルボキシメチル化した後，サーモリシンを用いてpH7～8，80℃，20分反応させる。

Ⅱ：シアル酸を残さなくても良い場合
pH2.0でペプシン消化を行う。

・糖タンパク質のようにペプチド部の分子量の大きいものは，そのコンフォメーションによって比較的よく糖鎖を遊離するものと，ほとんど遊離しないものがあります。同じモル数の糖鎖結合部位の数に対して，糖ペプチドに加えるべき酵素量の10倍を糖タンパク基質に加えても糖鎖が遊離しない場合は，タンパク質の変性や，プロテアーゼ消化する必要があります。
・糖タンパク質を変性させてもよい場合，この酵素は種々の変性剤に比較的強いので，糖タンパク基質を変性させて酵素反応をおこなうこともできます。例として，～0.75M NaSCN（チオシアン酸ナトリウム），1～3M塩酸グアニジン，0.1%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）などの存在下で反応させることができます。
・10mMのCu^{2+}，Fe^{2+}は阻害剤様に働きます。

1-3 *O*-グリカナーゼの反応

1-3-1 使用する試薬

・*O*-グリカナーゼ（endo-*α*-*N*-acetylgalactosaminidase）
・0.2M リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）
・冷エタノール

1-3-2 操作

1．糖タンパク質（25～35*μg*）に200*μℓ* の0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を添加し，良く混和する。
2．3mUnitの*O*-グリカナーゼを加える。
3．37℃ 16時間反応させる。
4．沸騰水浴中で溶液を3分間加熱して反応をとめる。
5．3倍量の冷エタノールを添加し，10分間遠心（5,000G）する。
6．上清を回収する。

1-3-3 参考

5，6の操作は限外ろ過フィルターを用いて，遠心濾液中のオリゴ糖を回収することもできます。

1-3-4 注意

・*O*-グリカナーゼの場合，O型糖鎖を全て切断するわけではなく，由来の微生物種により基質特異性が異なるので注意が必要です。*Diplococcus, Alcaligens*由来の場合，Gal*β*1-3GalNAc→Ser（Thr）の2糖構造（1型）のみを遊離します。
・*Alcaligens*由来の酵素の至適pHは4.5ですが，中性付近でも比較的高い活性を維持しています。

2 ヒドラジン分解による糖鎖の切出し（液相式）

2-1 使用する機器や器具

・真空ポンプ（到達真空度10^{-4}mmHg，排気速度100ℓ/㎥程度）

・冷却トラップ一式（−50℃ぐらいに冷やす能力のある投げ込み式冷却器，デュワー瓶，トラップ瓶）

・ドライブロックヒーターまたはオーブン（100℃に温度制御できるもの）

・ネジ口バイアルまたはネジ口試験管

・デシケーターなど

2-2 試薬

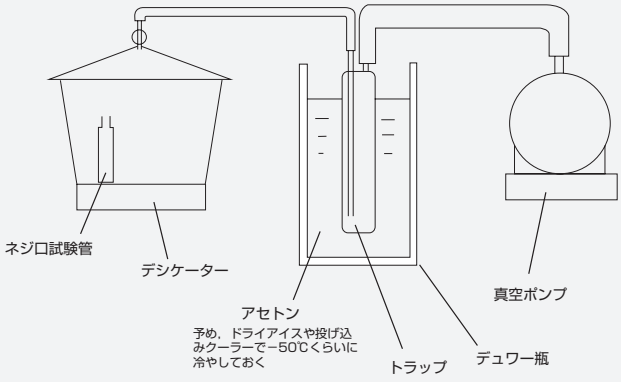
・無水ヒドラジン　（ヒドラジン−水和物を用いてはならない）

・トルエン

2-3 ヒドラジン分解操作

1. タンパク質 200〜500μg（5㎜ol相当）をネジ口バイアルまたはネジ口試験管に入れ凍結乾燥する。
2. 無水ヒドラジン100μℓを加えて，蓋をしてドライブロックヒーターまたはオーブンで100℃，8〜10時間加熱する。
3. トルエンを数滴加え，デシケーターに試料バイアルを入れ，冷却トラップを付けた真空ポンプで数時間以上減圧しヒドラジンを共沸留去する。
4. 3の操作を数回繰り返し，ヒドラジンを完全に留去する。

ヒドラジンの留去



2-4 注意点

・ヒドラジン分解は，極微量の水の影響をも受けてしまうため，使用する器具，試料は念入りに乾燥しておくこと。また無水ヒドラジンも，ヒドラジン分解用の高純度のものを入手すること。

・ヒドラジンの留去は，意外に時間がかかる。数日かけてでも完全に留去すること。

3 ヒドラジン分解による糖鎖の切出し（気相式）

3-1 使用する機器や器具

・ヒドラクラブY2100（品番：J801，右図）

・真空ポンプ（排気量50 ℓ /min.　到達真空度10^{-2}torr以上）

・排気ゴム管（内径6㎜　外径15㎜）

・温度計（−80℃まで測定できるもの）

3-2 使用する試薬

・Hydraclub ヒドラジン分解試薬 Hydrazinolysis Reagent Y（品番：J803）

・アセトン（約1 ℓ ）

・ドライアイス（約400 g ）

3-3 操作

ヒドラクラブの詳しい操作方法は取扱説明書をご参照ください。

1. ヒドラクラブ付属の反応容器をヒドラクラブ内で120℃約12時間乾燥させる。試料は付属の反応用試験管にいれ乾固しておく（0〜10㎎）。
2. 十分乾燥された反応容器内に試料の入った試験管を入れてヒドラクラブにセットする。
3. ヒドラジン分解試薬のヒドラジンバイアルを反応容器内に注入させる。
4. *N*-グリコシド糖鎖を切り出す場合は，100℃，4h，*N*-グリコシド糖鎖および*O*-グリコシド糖鎖を同時に切り出す場合は，80℃，6h加熱する。
5. 反応中にヒドラジン冷却トラップ（アセトン-ドライアイス）を準備する。
6. 反応終了後，真空ポンプを使って反応容器内のヒドラジンを除去する。
7. 反応容器から反応用試験管を取り出し*N*-アセチル化処理（次頁4）をおこなう，もしくは，試験管ごと−20℃保存。

4 *N*-アセチル化と脱塩操作

ヒドラジン分解後の糖鎖の還元末端は，グリコシルアミンになっています。また，*N*-アセチル基（もしくは*N*-グリコリル基）は，アミノ基（-NH_2）になっています（下図参照）。

ここで紹介します「*N*-アセチル化」操作により，グリコシルアミンは切断され，アミノ基は*N*-アセチル基に戻ります。（下図参照。ただし，元々*N*-グリコリル基だった場合も，*N*-アセチル基になってしまいます。）

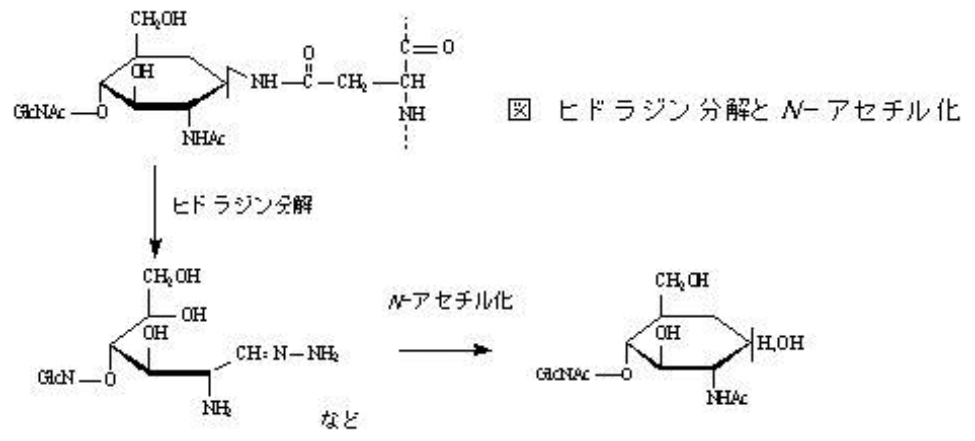


図　ヒドラジン分解と *N*-アセチル化

4-1 使用する機器や器具

・ディスポーザブルシリンジ（20mℓ）

・シリンジフィルター（0.45μm）

・ピペットマン（1000，200，20μℓ）

・細いチップ（クリスタルロング　200μℓ）　家田貿易株式会社　No.1055

・ディスポーザブルカラム

・試験管エバポレータ

・アスピレータ

・試験管（15mm×100mm）

4-2 使用する試薬

・無水酢酸

・炭酸水素ナトリウム水溶液（使用量：1mℓ／1mg 糖タンパク質）
炭酸水素ナトリウムをはかり取り，純水を加える（＞1.1 g/10mℓ純水になるように）15分間ほど攪拌後，ディスポザブルシリンジ（20mℓ）およびシリンジフィルター（0.45μm）を用いて溶解しなかった炭酸水素ナトリウムをろ過して除く

・*n*-オクタノール

・Dowex 50W×8（H+型,100-200）（ムロマチテクノス株式会社）カラム（充填された市販品もある）
ディスポーザブルカラムに1mℓのDowex 50W×8を充填する
カラム体積の30倍以上の純水で洗浄する

・氷

4-3 操作

※0.5㎎の糖タンパク質をヒドラジン分解した場合について，操作のスキームを記載している。

※0.5㎎以上の場合，試薬量，カラム樹脂量を比例して増やし，0.5㎎以下の場合，0.5㎎時と同量でおこなう。

※操作中，発生する炭酸ガスにより，液が吹きこぼれないよう注意する。

1. ヒドラジン分解した試料に，飽和炭酸水素ナトリウム水溶液　500㎕を加え，攪拌
2. 氷水中に置き，充分冷却
3. 無水酢酸　5㎕を加え，攪拌
4. 5分放置
5. 3−4の操作を更に4回おこなう
6. 氷水中から取り出す
7. 無水酢酸　25㎕を加え，攪拌
8. 泡（炭酸ガス）がほとんど出なくなるまで放置（30分程度）
   （炭酸ガスが残っていると，次の操作のカラム中に気泡が発生し，充分な流速が得られなくなる）
9. Dowex 50W×8カラム（1㎖）に通す
10. 純水　5㎖（カラム体積5倍量）でカラムを洗浄する
11. 全量を回収する
12. 回収した溶液　2㎖を試験管に移し，突沸防止のため，*n*-オクタノールを数滴落とす。
13. 試験管エバポレータを用いて減圧下で濃縮乾固する（シアル酸の遊離を防ぐために温度を35℃以下に設定する）
14. 12−13の操作を繰り返し，全量を濃縮乾固する

本稿をご提供いただきました株式会社J-オイルミルズの皆様に心より感謝申し上げます。